

استفاده از روش‌های مولکولی RFLP-PCR و توالی‌یابی مستقیم جهت تعیین

ژنوتیپ‌های هپاتیت B در زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی استان تهران

چکیده

زمینه و هدف: عفونت حاصل از هپاتیت B یک مشکل جدی بهداشت جهانی است. طبق ارزیابی‌هایی که تاکنون انجام شده، هر ساله حدود ۵۰۰۰۰۰ تا ۱/۲ میلیون مرگ ناشی از هپاتیت مزمن، سیروز و هپاتوسلولار در سراسر جهان گزارش می‌شود. از آنجائی که داده‌های اپیدمیولوژیکی حاصل از تعیین ژنوتیپ‌ها و ساب ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت B، کمک شایانی در برنامه‌های واکسیناسیون، درمان‌های ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماری را فراهم می‌سازد، لذا بر آن شدیم تا ژنوتیپ‌های این ویروس را در زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی مورد بررسی قرار دهیم.

روش کار: در تحقیقی که به صورت مقطعی در سال ۲۰۰۸، بر روی ۱۲۲ نمونه سرمی از افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی حامل HBsAg جهت تعیین نوع ژنوتیپ ویروس HBV در سطح استان تهران انجام گردید، با استفاده از روش‌های مولکولی مقرون به صرفه PCR و RFLP، ژنوتیپ آنها تعیین شد. سپس آزمایشات تأییدی توالی‌یابی مستقیم انجام و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک (Bioedit, Mega, ClustalW) ترسیم گردید و به وسیله آزمون آماری SPSS16، $P < 0.05$ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۱۱۵ نمونه سرمی پس از انجام Nested PCR مثبت گزارش شدند. ژنوتیپ کلیه نمونه‌ها پس از RFLP با استفاده از آنزیم‌های برشی (HpaI, DpnI, EaeI, StyI, BsrI) و همچنین توالی‌یابی مستقیم به همراه رسم درخت فیلوژنتیکی با روش Neighbor-Joining، در ۱۰۰٪ نمونه‌ها، ژنوتیپ D (ساب ژنوتیپ D1 و ساب تایپ ayw2) را نشان دادند.

نتیجه گیری: در این پژوهش از ۱۱۵ نمونه سرمی مورد مطالعه، مشخص گردید که ژنوتیپ غالب در زندانیان مبتلا، ژنوتیپ D می‌باشد. به عبارتی گونه‌های ژنوتیپی HBV ایرانیان در ارتباط نزدیک با یکدیگر و همگون می‌باشند. حضور این ژنوتیپ با پایین بودن میزان بیماری‌های شدید کبدی ناشی از عفونت مزمن هپاتیت B (سیروز، هپاتوسلولار کارسینوما) در ایران مطابقت دارد.

کلیدواژه‌ها: ۱- ژنوتیپ هپاتیت B ۲- افراد معتاد حامل HBsAg ۳- PCR ۴- RFLP

فاطمه سالم I

دکتر محمد رضا آقا صادقی II

فوزیه جوادی III

دکتر فرزین روحوند IV

مهسا جولایی IV

گلناز بهرامعلی V

احسان مصطفوی VI

دکتر حسین غلامی VII

* دکتر سهیلا حکمت VIII

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۱۸

مقدمه

ویروس هستند که اکثر آنها در آسیای جنوب شرقی زندگی می‌کنند و دو میلیون نفر را در ایران درگیر نموده است. حاملان ویروس منبع اصلی انتشار آن در جامعه بوده و هر سال حداقل ۱ میلیون نفر در جهان در

عفونت هپاتیت B یک مسئله مهم بهداشت جهانی است که توسط ویروس هپاتیت B انتقال می‌یابد.^(۱) در حال حاضر دو میلیارد انسان در جهان در معرض ویروس HBV قرار گرفته که بیش از ۳۵۰ میلیون نفر حامل این

این مقاله خلاصه ای است از پایان نامه خانم فاطمه سالم جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر محمد رضا آقا صادقی و مشاوره خانم دکتر سهیلا حکمت، با حمایت سازمان انسیتو پاستور، تهران، ایران سال ۱۳۸۸.

(I) دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(II) استادیار بیوتکنولوژی، گروه هپاتیت وایدز، انسیتو پاستور، تهران، ایران

(III) کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، گروه هپاتیت وایدز، انسیتو پاستور، تهران، ایران

(IV) کارشناس بیولوژی، گروه هپاتیت وایدز، انسیتو پاستور، تهران، ایران

(V) کارشناس ارشد ژنتیک، گروه هپاتیت وایدز، انسیتو پاستور، تهران، ایران

(VI) دکترای آمار، گروه اپیدمیولوژی، انسیتو پاستور، تهران، ایران

(VII) دکترای حرفه ای علوم آزمایشگاهی، معاون اجرایی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت، تهران، ایران

(VIII) دکترای حرفه ای دامپزشکی، عضو هیأت علمی گروه هپاتیت وایدز، انسیتو پاستور، تهران، ایران (* مؤلف مسئول)

رشته ای با ۳۲۰۰ جفت باز می‌باشد که دارای چهار قالب خواندنی (Open Reading Frame) به نامهای S, C, P, X می‌باشد که تا اندازه ای با یکدیگر همپوشانی دارند. (۳) ORF S کلاً با ORF P همپوشانی دارد و هر سه پروتئین سطحی ویروس یعنی SHBs, MHBs, LHBs را کد می‌کند به این ترتیب که رونویسی و ترجمه سه ناحیه Pre-S₁, Pre-S₂, S منجر به تشکیل LHBs شده و ترجمه نواحی S, Pre-S₂ منجر به تولید MHBs و ترجمه ناحیه S منجر به تولید SHBs می‌گردد که بیشترین آنتی‌ژن موجود در سه نوع ذره ویروسی را تشکیل می‌دهد. (۴) پروتئین‌های متوسط و بزرگ به عنوان شاخص‌های اتصالاتی HBV برای اتصال به گیرنده‌های هپاتوسیت‌ها عمل کرده و به عنوان اپی توپ‌های لنفوسیتی نیز ایفای نقش می‌کنند. (۵) در مطالعه حاضر از توالی ژن S بهره گرفته شده است، توالی ژن S بسیار محافظت شده نسبت به نواحی ژن Pre-S می‌باشد از آنجایی که این ژن با جایگاه فعال ترانس کریپتاز معکوس ژن P همپوشانی دارد، برای تعیین ژنوتیپ نسبت به نواحی Pre-S بسیار مناسب تر می‌باشد.

با استفاده از آنالیزهای تکاملی پیشرفته و بر اساس شباهت بین ژنوم کامل ویروس، تا کنون ۸ ژنوتیپ HBV (A-H) شناسایی شده اند که بر پایه بیش از ۸٪ تنوع توالی کامل ژنوم می‌باشد، علاوه بر ژنوتیپ‌های مختلف، این ویروس بر اساس تغییرات موجود در لوپ هیدروفیل خارجی پروتئین HBs به زیر تیپ‌هایی تقسیم می‌شود که بر اساس آنتی‌ژنیسیته متفاوت خود با استفاده از روش‌های سرولوژیک قابل تمییز از یکدیگر هستند. (۶) به عنوان نمونه ساب ژنوتیپ‌های HBV شامل A₁, A₂, B, C₁, C₂, D₁, D₂ و ... می‌باشد لازم به ذکر است که بر پایه آنالیز کامل توالی ژنوم، ژنوتیپ‌های B, C, D هر کدام به ۴ ساب ژنوتیپ طبقه بندی می‌شوند. (۸) همه ژنوتیپ‌های HBV منجر به بیماری کبدی شده ولی علایم کلینیکی متفاوتی را از خود بروز می‌دهند به عنوان مثال بیماران آلوده به ژنوتیپ C یا D هپاتیت B معمولاً میزان بالایی از موتاسیون را در ناحیه

پروموتور مرکزی نشان داده و در مقایسه با ژنوتیپ‌های A و B میزان پاسخ کمتری را به درمان اینترفرون دارند و باعث پیشرفت سریع بیماری به سمت سیروز کبدی و سرطان کبد خواهند شد. (۹) اما گزارشات متضاد در ارتباط با ژنوتیپ‌های HBV نیز وجود دارد به عنوان نمونه ژنوتیپ HBV/B₂ نسبت به ژنوتیپ HBV/C در جوانان تایوانی که سیروز کبدی ندارند بیشتر دیده شده است هم چنین در اسپانیا ژنوتپ HBV/D نسبت به ژنوتیپ HBV/A در ارتباط کمتری با بیماری‌های شدید کبدی و سرطان می‌باشد. (۱۰، ۱۱)

گسترده‌ی ژنوتیپ‌های HBV در بخشهای مختلف جغرافیایی جهان متفاوت است به عنوان نمونه ژنوتیپ A هر چند توزیع جهانی دارد اما بیشتر در قسمت مدیترانه ای، اروپا، آمریکای شمالی، آفریقا و ژنوتیپ B, C در بیماران آسیایی دیده می‌شود. ژنوتیپ D بیشتر در ناحیه مدیترانه، خاورمیانه، اروپای جنوبی و ژنوتیپ E در بین حاملین آفریقای جنوبی غالب است. دو ژنوتیپ H و G در آمریکای شمالی، فرانسه، مکزیک و ژنوتیپ F در آمریکای مرکزی مشاهده شده است. (۱۲-۱۴)

یکی از راههای انتقال عفونت HBV استفاده از سرنگ آلوده می‌باشد که در انتقال عفونت‌های با منشأ خونی نقش مهمی ایفا می‌کند. با توجه به اینکه ایران جزء نواحی با شیوع متوسط رو به پایین (۱-۳٪) قرار دارد، اما شیوع این ویروس در بین زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی (IVDU) حدود ۵-۴٪ می‌باشد. (۱۵) در تحقیق حاضر از سرم افراد پر خطر جامعه (IVDU) استفاده شده است. از آنجایی که این افراد در محیط‌های ایزوله قرار دارند بنابراین امکان ارتباط جنسی و استفاده از سرنگ مشترک بسیار زیاد است. لذا بر آن شدیم تا مطالعه ای بر روی ژنوتیپ‌های این گروه پر خطر (IVDU) انجام داده تا با اطلاع از نوع ژنوتیپ این افراد در درمانهای ضد ویروسی و پیشگیری از این بیماری بتوان اقدامات لازم را به انجام رسانید.

از آنجایی که تنوع ژنوتیپی HBV در ارتباط با

الگوهای بالینی متفاوت از عفونت، سختی بیماری کبدی، پیشرفت سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما، حضور ویروس و پاسخ به درمانهای ویروسی بوده، آگاهی از توزیع ژنوتیپ‌های HBV از اهمیت بالایی در برنامه‌های واکسیناسیون، درمانهای ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماریها برخوردار می‌گردد.^(۱۶) لذا از روشی مقرون به صرفه PCR-RFLP (با استفاده از ناحیه ژن S) که قابلیت شناسایی کلیه ژنوتیپ‌ها را داشته باشد بهره گرفته شد و ژنوتیپ‌های این ویروس در معتادان به مواد مخدر تزریقی به عنوان گروه پر خطر تعیین تا در مطالعات مقیاس انبوه در برنامه کشوری، تحقیقات اتیولوژیکی و کلینیکی مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار

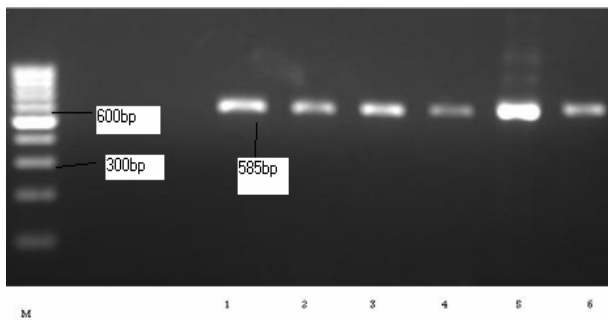
تعداد ۱۲۲ نمونه سرم معتادان تزریقی که همگی آنها از جنس مرد و میانگین تقریبی سنی ۳۴ تا ۵۴ سال برخوردار بودند تهیه گردید. ضمناً بیشتر افراد نمونه‌گیری شده ساکن شهرستانهای تهران و کرج بوده که به همراه پرسشنامه آنها از ندامتگاههای کرج، رجایی شهر، قزل حصار گردآوری شد. جهت بررسی و تأیید HBsAg، تست ELISA (با استفاده از کیت Bioprobes) انجام گرفت. پس از تأیید سرولوژیکی نمونه‌ها، DNA آنها از ۲۰۰ ماکرولیتر سرم توسط کیت استخراج DNA، High Pure Viral (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) ساخت شرکت Roche تخلیص گردید. جهت انجام Nested-PCR، بر روی ناحیه به شدت محافظت شده ۵۸۵ جفت بازی ژن S از ژنوم HBV، یک جفت پرایمر خارجی: O-HBV-F (۲۸۲۰- O-HBV-R، ۵′- GGGACACCATATTCTTGG-3′، nt۲۸۳۷-۸۴۲) برای مرحله اول و یک جفت پرایمر داخلی: I-HBV-F (۲۲۱-۲۰۳) I-HBV-R، ۵′- GCGGGGTTTTTCTTGTGA-3′، nt ۷۷۷-۷۶۷) برای مرحله دوم از نواحی مورد نظر طراحی و توسط شرکت Metabion international AG در کشور آلمان ساخته

شد. برنامه PCR بر اساس روش ارائه شده توسط Guo-Bing Zeng و همکاران انجام گردید که برنامه PCR برای راند اول و دوم ۳۵ سیکل در نظر گرفته شد که شامل دمای جدا شدن اولیه دو رشته الگو در ۱۸۰ ثانیه در ۹۴ °C، دمای جدا شدن دو رشته الگو در ۴۵ ثانیه در ۹۴ °C، دمای اتصال پرایمر به الگو در ۶۰ ثانیه در ۵۳ °C، دمای پیشروی در ۹۰ ثانیه در ۷۲ °C، دمای پیشروی نهایی در ۳۶۰ ثانیه در ۷۲ °C بود.^(۱۷) سپس محصولات PCR، به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۲٪، با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و در نهایت در زیر نور U.V مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جهت تعیین ۸ ژنوتیپ شایع Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (A-H) HBV (با استفاده از ۵ آنزیم BsrI، HpaII، DpnI، EaeI، StyI (ساخت شرکت فرمنتاز) هضم آنزیمی انجام پذیرفت.^(۱۷) همچنین محصولات هضم آنزیمی (RFLP) نیز مانند محصولات Nested-PCR در ژل آگارز ۳٪ با نور U.V مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور تأیید نتایج اولیه تعدادی از محصولات PCR پس از تخلیص از روی ژل به کمک کیت purification kit ساخت شرکت (Roche)، مورد توالی یابی مستقیم (Sequence Laboratories Gottingen GmbH, SEQ Lab, Germany) قرار گرفت. با استفاده از نرم افزارهای Mega، Bioedit و Clastal W نمونه‌ها مورد ارزیابی مقایسه‌ای قرار گرفتند. بر اساس نتایج توالی یابی به دست آمده درخت فیلوژنتیکی به وسیله روش Neighbor-Joining که متداولترین روش است ترسیم شد. واطلاعات آماری به کمک نرم افزار (SPSS Version 16)، $P < 0.05$ تحلیل گردید.

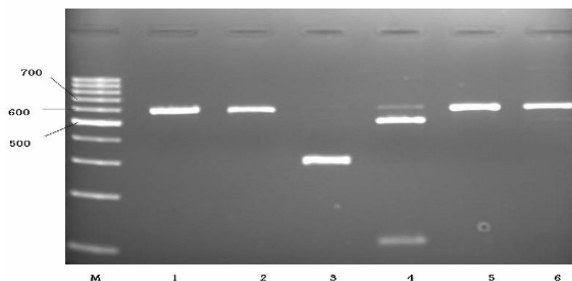
یافته‌ها

تعداد ۳۰۰۰ نمونه سرمی جمع‌آوری شده با استفاده از روش ELISA جهت تعیین آنتی ژن HBsAg مورد بررسی قرار گرفت که ۱۲۲ نمونه (۴٪) آنها مثبت گزارش شد. پس از انجام Nested-PCR برای نواحی ۲۰۳ تا ۷۸۷ ژنوم ویروس،

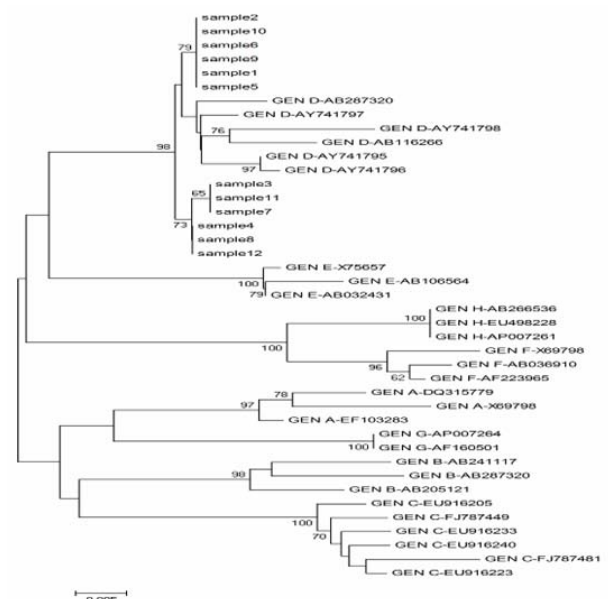
ارزیابی گشت (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۱- PCR ناحیه S ژنوم HBV (۵۸۵ جفت بازی) در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت B: M: مارکر (۱۰۰bp)، ۱-۶: نمونه‌های شش بیمار مبتلا به HBV



شکل شماره ۲- آنالیز هضم آنزیمی ناحیه S ژنوم HBV در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت B
M: مارکر (۱۰۰bp)، ۱: نمونه un digest، ۲: هضم با آنزیم HpaII، ۳: هضم با آنزیم DpnI، ۴: هضم با آنزیم EaeI، ۵: هضم با آنزیم StyI، ۶: هضم با آنزیم BsrI



شکل شماره ۳- آنالیز فیلوژنتیکی نوای S، (Samples 1-12) HBV جدا شده از زندانیان مبتلا

۱۱۵ نمونه حاوی HBVDNA بوده و ۷ نمونه منفی گزارش شدند (شکل شماره ۱). سپس به روش RFLP و با استفاده از ۵ آنزیم (آنزیم StyI با مکان شناسایی BsrI، (با مکان شناسایی DpnI، (با مکان شناسایی HpaII، (با مکان شناسایی EaeI، (با مکان شناسایی TGGCCA) الگوی ژنوتیپی بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت که بررسی هضم آنزیمی ۵ الگوی مختلف در ۱۲۲ نمونه سرمی نشان دهنده ژنوتیپ D در نواحی nt۲۸۹ و nt۲۹۶ بودند (شکل شماره ۲).

به کمک هضم آنزیمی می‌توان نوع ژنوتیپها را شناسایی نمود بدین صورت که هضم آنزیمی StyI در موقعیت nt ۴۵۵ منجر به ایجاد دو قطعه ۲۵۳ و ۳۳۲ جفت بازی و ایجاد ژنوتیپ C خواهد شد. هضم آنزیمی BsrI در موقعیت nt ۳۲۸ باعث ایجاد دو قطعه ۱۲۶ و ۴۵۹ جفت بازی و ایجاد ژنوتیپ B و هضم آنزیمی آن در موقعیت nt ۵۰۲ منجر به تشکیل دو قطعه ۳۰۰ و ۲۸۵ جفت بازی و ایجاد ژنوتیپ A/E/G خواهد شد. عدم هضم آنزیمی StyI و BsrI بیانگر وجود ژنوتیپهای D/F/H می‌باشد.

هضم آنزیمی EaeI در موقعیت nt ۳۰۲ باعث ایجاد دو قطعه ۱۰۰ و ۴۵۸ جفت بازی و هضم آنزیمی HpaII در موقعیت nt ۷۰۶ باعث به وجود آمدن دو قطعه ۸۱ و ۵۰۴ جفت بازی به ترتیب موجب تشکیل ژنوتیپهای A و E خواهند شد. عدم هضم آنزیمی این دو آنزیم ژنوتیپ G را موجب خواهد شد. هضم آنزیمی HpaII در موقعیت nt ۲۹۲ باعث تشکیل دو قطعه ۹۰ و ۴۹۵ جفت بازی می‌شود و ژنوتیپ F یا H را ایجاد می‌نماید.

هضم آنزیمی DpnI در موقعیت nt ۴۹۱ دو قطعه ۲۸۹ و ۲۹۶ را سبب می‌شود که باعث به وجود آمدن ژنوتیپ D می‌گردد.

نتایج حاصل از توالی‌یابی مستقیم با رفرنسهای ژنومی ویروس هپاتیت موجود در بانک‌های ژن مورد ارزیابی قرار گرفته و بیانگر ژنوتیپ D، ساب ژنوتیپ D1 و ساب تایپ ayw2 بوده که برای ارزیابی روش Neighbor-Joining با انجام ۱۰۰۰ بار Bootstrap resampling صحت درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده

بحث و نتیجه گیری

شیوع بیماری هپاتیت B در تمام جهان به صورت اندمیک می‌باشد و تقریباً ۹۰٪ جمعیت جهان در مناطق با شیوع بالا (بیش از ۸٪ HBsAg) و یا با شیوع متوسط (۸-۲٪ HBsAg) زندگی می‌کنند.^(۸) هپاتیت B در ایران، بحرین، کویت شیوع پایین و در آمریکا، امارات شیوع متوسط و در عمان، فلسطین، یمن و سوئد شیوع بالایی را دارد. در کشور ایران به طور متوسط ۱-۳٪ جمعیت حامل ویروس هپاتیت B هستند ولی میزان شیوع در استانهای مختلف متفاوت است. به عنوان نمونه در استان فارس ۱/۷٪ و در سیستان و بلوچستان به بیش از ۵٪ می‌رسد.^(۹،۱۰،۱۸) در ایران HBV شایعترین علت سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار کبدی می‌باشد و سالانه ۱۰۰ هزار نفر از این تعداد نیاز به بستری شدن و حدود ۶۰۰ نفر هم سالانه در اثر عوارض ناشی از هپاتیت B فوت می‌شوند.^(۲۰)

اعتیاد به مواد مخدر تزریقی و انتقال فراورده‌های خونی آلوده مهمترین راه انتقال هپاتیت‌های ویروسی در ایران به شمار می‌روند و کشور ایران به علت قرار داشتن در شاهراه ترانزیت مواد مخدر و نیز جایگاه نسبتاً موجه مصرف تریاک در فرهنگ ایرانی همواره با خطر و عوارض اجتماعی اعتیاد رو به رو بوده است. تخمین زده می‌شود که حدود ۲ میلیون نفر معادل ۳٪ از کل جمعیت ایران به نوعی از مواد مخدر استفاده می‌کنند و معطادان تزریقی به عنوان گروه پر خطری شناخته می‌شوند که بیش از افراد عادی جامعه در معرض آلودگی قرار دارند و به عنوان منابع خطرناک برای انتشار بیماریهای عفونی مانند ایدز و انواع هپاتیت (B و C) محسوب می‌شوند و ابتلا به گونه‌های مختلف ویروس هپاتیت موجب بروز بیماری با شدت بیشتر خواهد شد و در این موارد پاسخ به درمان با داروهای ضد ویروسی کم می‌شود. از فاکتورهای خطر در انتقال این عفونتهای ویروسی در افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی (IVDU)، استفاده از سرنگ مشترک می‌باشد که

وضعیت زندان نیز ریسک این عفونتها را افزایش می‌دهد. به همین جهت یک ارتباط مثبت بین زندانی شدن افراد و انتقال این بیماری‌ها وجود دارد.^(۲۱)

مطالعات زیادی نشان داده است که میزان شیوع عفونتهای خونی در بین IVDU، زندانیان یا زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی در بخشهای مختلف آسیا متفاوت است.^(۲۲)

شیوع هپاتیت B و C در زندانیان ایرلندی ۶٪ و ۲۲٪، در زندانیان ایسلندی ۲/۲۰٪ و ۲۲/۲٪، در میان زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی دانمارکی و مکزیک به ترتیب ۶۴٪، ۸۷٪ و ۱/۶۱٪، ۸۲٪، در افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی در مانیپور (شمال شرقی هند) ۱۰۰٪ و ۹۲٪ گزارش شده است.^(۲۳-۲۷)

در مطالعه ای که بر روی ۱۶۱ مصرف کننده دارو در کراچی، پاکستان در سال ۲۰۰۳ صورت پذیرفت شیوع هپاتیت B ۷/۵٪ بود که دلیل اصلی فاکتور خطر در ابتلا به عفونت B و C در پاکستان را می‌توان استفاده مشترک از سرنگ بیان نمود.^(۲۸)

در یک مطالعه که بر روی افراد زندانی معتاد به مواد مخدر تزریقی در ایران صورت گرفت ۵۱ زندانی (۳/۵٪) دارای هپاتیت B و ۵۱۳ نفر (۳۵/۸٪) دارای هپاتیت C می‌باشند که بیشترین رفتار پر خطر در این گروه استعمال مواد مخدر تزریقی، تاتو کردن و استفاده مشترک از تیغ ریش تراشی می‌باشد.^(۲۹) هم چنین میزان شیوع عفونتهای HIV و HCV در بین افراد IVDU در زندانهای شیراز در استان فارس از ایران ۳۰٪ و ۷۸٪ گزارش شده است.^(۳۰)

طبق مطالعات انجام گرفته از ۳ زندان استان تهران در تحقیق حاضر، ۳۰۰۰ نفر از زندانیان IVDU مورد آزمایشات سرولوژیکی قرار گرفتند که تعداد ۱۲۲ نفر (۴٪) HBsAg مثبت بودند و از این تعداد ذکر شده ۹/۸٪ و ۵/۷٪ مبتلا به عفونت همزمان HIV و HCV به ترتیب می‌باشند که بیشترین رفتار پرخطر در این گروه را می‌توان استفاده مشترک از سرنگ بیان نمود. لازم به

ذکر است که به دلیل مسائل اخلاقی (عدم صداقت در گفتار زندانیان در ارتباط با رفتارهای پر خطر جنسی، گاهاً مشاهده شده که منجر به تغییر روند در تفسیر تحقیقات از مسیر اصلی خود می‌شود. لذا در قیاس با دیگر زندانیان کشورهای مختلف (ایرلند، ایسلند، دانمارک و...) درصد آماری بیماری هپاتیت B در ایران مشابه کشور ایرلند می‌باشد. لازم به ذکر است که از دلایل مهم پایین بودن آمار ایران در مقایسه با سایر کشورها را می‌توان به برنامه واکسیناسیون کشوری، تشکیل کلینیک‌های مثلی و افزایش آگاهی راههای انتقال این بیماری در بین زندانیان بر شمرد.

تعیین ژنوتیپ یک شاخص ژنتیکی برای ژنوم بوده که ژنها بر پایه حذف شدن، اضافه شدن و جانشینی نوکلئوتیدها طبقه بندی می‌شوند. این اطلاعات ژنوتیپی گونه‌های ویژه ویروسی و رفتارهای مولکولی را از گونه تعیین می‌نماید و برای نتایج کلینیکی مفید و سودمند می‌باشد. (۳۱ و ۳۲)

لذا کشف احتمال ارتباط نوع ژنوتیپ ویروس با شدت بیماری زایی و وانمودهای بالینی و همین طور پاسخ به دارو و درمان، میزان حساسیت آزمایشات کیفی و حتی ارتباط نوع ژنوتیپ با امکان شیوع ناگهانی هپاتیت B، حاد و یا مزمن شدن بیماری، تعیین ریشه و مبدأ عفونت و واکسیناسیون از اهمیت به سزایی می‌باشد. (۳۳ و ۳۴)

به نظر می‌رسد که تنوع ژنوتیپی HBV بر الگوهای بالینی متفاوت از عفونت، سختی بیماری کبدی، پیشرفت سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما، حضور ویروس و پاسخ به درمان ویروسی مؤثر بوده و آگاهی از توزیع ژنوتیپ‌های HBV از اهمیت بالایی در برنامه‌های واکسیناسیون، درمانهای ضد ویروسی، تشخیص و پیشگیری از بیماریها برخوردار می‌باشد. (۳۳ و ۳۵)

Chane و همکاران گزارش کردند که ژنوتیپ HBV C به ویژه ژنوتیپ C_e باعث افزایش خطر سرطان کبد در بیماران هپاتیت مزمن می‌شود. (۳۶) در حالیکه در کشور

هند و پاکستان ژنوتیپ D نسبت به ژنوتیپ A در ارتباط بیشتر با بیماری‌های شدید کبدی (HCC) می‌باشد. (۹) داده‌ها ارتباط بین ژنوتیپ‌های HBV و پاسخ به درمان را نیز تأیید نموده اند. در مطالعه ای در آلمان که بر روی ۶۴ بیمار مبتلا به HBV انجام گرفت، نشان داد که ژنوتیپ A نسبت به ژنوتیپ D (۳۷٪ در مقابل ۶٪) پاسخ بیشتری به INF (اینترفرون) می‌دهد. (۳۷) همچنین مطالعات Kao بیان کرد که ژنوتیپ B (۴۱٪) نسبت به ژنوتیپ C (۱۵٪) در درمان ضد ویروسی پاسخ بهتری به INF می‌دهد. (۱۶)

برخلاف پاسخ‌های اینترفرونی، مطالعات بر روی ژنوتیپ‌های HBV و درمان با لامی و دین بر روی شمار کمی از بیماران و هتروژنوسیتی آنها در طی درمان صورت پذیرفته است. (۳۴) در مطالعه ای که بر روی بیماران با ساب تایپ adw صورت گرفت نشان داد که این ساب تایپ در مقایسه با ساب تایپ ayw در ارتباط بیشتری با مقاومت به لامی و دین می‌باشد. (۳۸)

ژنوتیپ HBV D در نواحی مدیترانه، خاورمیانه و جنوب شرق آسیا شایع می‌باشد به عنوان مثال نتایج مشابه در ترکیه نشان داده است که همه ۴۴ بیمار مطالعه شده ژنوتیپ D را دارند. (۳۹)

مطالعه دیگر در یمن نشان داد که ژنوتیپ D در جمعیت مقیم آنها غالب می‌باشد در حالیکه ژنوتیپ A تنها در کشورهایی که در ارتباط با کشورهای آفریقایی است دیده شده است. (۴۰)

بررسی‌ها در مصر نشان می‌دهد که ژنوتیپ D بیشترین شیوع ژنوتیپ HBV را دارد در مقابل ژنوتیپ‌های A, B, C در پاکستان غالب می‌باشد. (۴۱)

مطالعه بر روی ۱۰۹ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B در کراچی، همگی ۱۰۰٪ ژنوتیپ D و ۲ بیمار عفونت همزمان با ژنوتیپ A را نشان دادند. (۴۲)

نتایج مطالعه آنالیز فیلوژنتیکی از ناحیه Pre- s₂ ژن HBV در روسیه نیز ژنوتیپ D را به عنوان ژنوتیپ

ژنوتیپ ویروس و جمعیت مورد مطالعه (از نظر اپیدمیولوژیکی) وجود ندارد. این امر با نتایج قبلی به دست آمده در ایران، خاورمیانه، افغانستان، آسیای مرکزی، ترکیه، مصر، دهلی نو، بریتیش کلمبیا کاملاً مطابقت دارد.^(۴۶)

در پایان باتوجه به نتایج پژوهش به عمل آمده، به نظر می‌رسد که واکسیناسیون‌های برنامه ریزی شده در گروه‌های پر خطر، بخصوص زندانیان معتاد به مواد مخدر تزریقی، آموزش این افراد جهت پیشگیری از ابتلا به این عفونت و همچنین تقویت کلینیک‌های مثلی در سطح زندان‌ها و درمان‌های ضد ویروسی اختصاصی با لامی ودین و سایر نوکلئوزیدها علیه HBV-Genotype D درافراد آلوده و مبتلا به هپاتیت B می‌تواند انتقال HBV (از نوع ژنوتیپ D) را در جمعیت‌های در معرض خطر، کاهش دهد.^(۴۷) لذا همچنان برخورد ریشه ای و کارشناسی با موضوع اعتیاد و رسیدگی عاجل به وضع بهداشتی زندانهای کشور کماکان باید در رأس برنامه‌های سیاست‌گذاران و دست اندرکاران مربوطه در جهت رفع این معضل اجتماعی بهداشتی قرار گیرد.

غالب بیان کرد.^(۴۳) همچنین در هند تنها ژنوتیپ D و A به عنوان ژنوتیپ غالب می‌باشد و در دهلی نو ژنوتیپ D در بیماران مزمن کبدی شیوع بیشتری دارد.^(۴۴) در حالیکه در مانپور (شمال شرقی هند) ژنوتیپ HBV/ C در افراد IDU غالب می‌باشد و در ارتباط بیشتر با پیشرفت بیماری کبدی است.^(۴۵)

در مطالعه ای که توسط علویان و همکاران بر روی ۱۰۹ بیمار HBsAg مثبت با استفاده از روش هیبریداسیون معکوس انجام شده ۹۵ نفر (۸۶٪) هپاتیت مزمن، ۱۱ نفر (۱۰٪) سیروز کبد و ۳ نفر (۲/۷٪) حامل، همگی ژنوتیپ D را نشان دادند.^(۴۵)

طبق نتایج کلی بدست آمده در مطالعه حاضر و براساس یافته‌های حاصله، ژنوتیپ D (ساب ژنوتیپ D1 و ساب تایپ ayw_۲) به عنوان تنها ژنوتیپ موجود در بین افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی مبتلا به HBV معرفی شده است. در این پژوهش مشخص گردید که ژنوتیپ غالب در بیماران مبتلا، ژنوتیپ D می‌باشد به عبارتی گونه‌های ژنوتیپی HBV ایرانیان در ارتباط نزدیک با یکدیگر و همگون می‌باشند و هیچ گونه ارتباطی بین نوع

فهرست منابع

- 1- Kane M. Gloal program for control of hepatitis B infection. vaccine. 1995; 13: S47-S49
- 2- Maddray W.C: Hepatitis B: an important public health issue. J Med Virol. 2000; 61: 362
- 3- Lusida MI, Surayah, Sakugawa H, Nagano-Fujii M, Soetjijto, Mulyanto, et al. Genotypes and sub types analyses of hepatitis B virus and possible co-infection of HBV and Hepatitis C (HCV) or Hepatitis D (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in surabaya, Indonesia, Microbial. Immunol. 2003; 47(12): 969-75
- 4- Neurath AR, Adamowicz P, Kent SB, Riottot MM, Strick N, Parker K, et al. characterization of monoclonal antibodies specific for the pre-s2 region of the hepatitis B virus envelope protein. Mol. Immunol 1986; 23: 991-97
- 5- Neurath AR, Parker A M. Antibodies to a synthetic peptide from the pre- s 120-145 region of the hepatitis B virus envelope. neutralizing Vaccine. 1986; 4: 35-37
- 6- Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of two new outomated assayes for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection. J. Clin. microbial . 2003; 41:135-43
- 7- McMillan. Mutations in the hepatitis B virus precore /core gene and core promoter in patients with sever recurrent disease following liver transplantation. Hepatology. 1996; 24(6): 1371-378
- 8- Norder H , Courouce AM. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived world wide : Genotypes , sub genotypes and HBsAg subtypes. Intervirology 2004; 47: 289-309

- 9- Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile , spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002; 17: 165-70
- 10- Sanchez-Tapias JM, Costa J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long term out come of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 1848-856
- 11- Fields B N, Knipe D M, Howley P M. *Fields virology*. 3 rd ed. Philadelphia, Pa. Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1521-551
- 12- Kobayashi M, Arase Y , Ikeda K, Tsubota A , Suzuki Y, saito S, et al. Clinical characteristics of patients infect with hepatitis B virus genotypes A,B, and C. *J Gastroenterol*. 2002; 37: 35-39
- 13- Teles SA, Martins RM, Gomes SA, Gaspar AM, Araujo NM, Souza KP, et al . Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: Serological and molecular follow-up. *J Med Virol*. 2002; 68: 41-49
- 14- Stuyver L ,De Gendt S, Van Geyt C , Zoulim F , Fried M , Schinazi RF , et al . A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000; 81(pt1): 67-74
- 15- Alavian SM .Fallahiyan F , Lankarani KB. The changing of epidemiology viral hepatitis B in Iran. *J Gastrointestin Liver Dis* . 2007; 16: 403-6
- 16- Kao JH,Wu NH,Chen DS.Hepatitis B and the response to interferon therapy. *J Hepatol*.2000;3:998-1002
- 17- Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL.A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World Gastroenterol*. 2004; 10(21): 3132-136
- 18- Lavanchy D. Hepatitis B Virus epidemiology diseases burden, treatment, and current and emerging prevention and control; measures . *J Viral Hepat*. 2004; 11: 97-107
- 19- Yoshihiro K, Richard WC. *Molecular Biology of Virus*,CRC press. Inc.1994; chapter 8: 89-123
- 20- Merat S, Malek zadeh R, Rezvan H , Khatibian M. Hepatitis B in Iran. *Arch Iran Med*. 2000; 3:192-201
- 21- Keppler k, Stover H. Transmission of infectious diseases during imprisonment –result of a study and introduction of a model project for infection prevention in Lower Saxony, Germany. *Gesundheitswesen*. 1999; 61: 207-13
- 22- Ichimura H, Kurimura O, Tamura I, Tsukue I, Tsuchie H, Kurimura T. Prevalence of blood-borne viruses among intravenous drug users nd alcoholics in Hiroshima, Japan. *International Journal of STD and AID*. 1995; 6: 441-43
- 23- Long J, Allwright S, Barry J, Reynolds SR, Thornton L, Bradley F, et al. Prevalence of antibodies to Hepatitis B, Hepatitis C and HIV and risk factors entrants to Irish prisons, a national cross sectional survey. *BMJ*. 2001; 323(7323): 1209-13
- 24- Anonymous. Hepatitis B vaccination of inmates in correctional facilities. *MMWR Center for disease control and prevention*. 2004; 53(30): 681-83
- 25- Christensen PB, Krarup HB, Niesters HG, Norder H, Georgsen J. Prevalence and incidence of blood borne viral infections among Danish prisoners. *Eur J Epidemiol*. 2000; 16(71):1043-49
- 26- Samuel MC, Doherty PM, Bulterys M, Jenison SA. Association between heroin use needle sharing and tattoos received in prison with hepatitis B and C positivity among street-recruited injection drug users in new Mexico USA. *Epidemiol Infect*. 2001; 127(3): 475-84
- 27- Saha MK, Chakrabarti S, Panda S, Naik TN, Manna B, Chatterjee A, et al. Prevalence of HCV and HBV infection amongst HIV seropositive intravenous drug user and their non-injecting wives in Maipur, Indian. *J Med Res*. 2000; 111: 37-39
- 28-Alaf A, Shah SA, Zaidi NA, Memon A, Nadeem-ur-Rehman, Wray N. High risk behaviors of injection drug users registered with harm reduction program in Kraachi, Pakistan. *Harm Reduct J*. 2007; 4: 7
- 29- Alizadeh AH, Alavian SM, Jafari K, Yazdi N. prevalence of hepatitis C virus infection and its related risk factor s in drug abuser prisoners in Hamean-Iran.*World J Gastroenterol*. 2005; 11(26): 4085-89
- 30- Zamani S, Ichikawa S, Nassirimanesh B, Vazirian M, Ichikawa K, Gouya MM, et al. Prevalence and correlates of hepatitis C virus infection among injecting drug users in Tehran. *Int J Drug Policy*. 2007;18(5): 359-63
- 31- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, et al. Hepatitis B virus genotypes distribution among chronic hepatitis B virus carriers in shanghai china. *Intervirology*. 2001; 44: 43-47

- 32-Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin liver Dis.* 2003; 23: 5-20
- 33-Swenson PD, Riess JT, Krueger LE. Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies. *Virol Methods.* 1991; 33: 27-38
- 34-Courouce-Pauty AM, Plancon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox sang.* 1983; 44:197-211
- 35-Karin K- Ljunggren. Genetic Variability in Hepatitis B Viruses. *J of General Virology.* 2000; 83: 1267-280
- 36-Chane HL, Tse CH, Mo F, Koh J, Wong VW, Wong GL, et al. High Viral load and Hepatitis B virus subgenotype Ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 177-82
- 37-Erhardt A, Heineke U, Blondin D, Gerlich W, Adams O, Heintges T, et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology* 2000;31:716-725.
- 38-Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J. et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotype in china. *J Viral Hepat.* 2005; 12: 609-17
- 39-Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B, et al. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection.* 2004; 32: 24-29
- 40-Sallam TA, William Tong CY. African links and Hepatitis B virus genotypes in the republic of Yemen. *J Med Virol.* 2004; 73: 23-28
- 41-Saudy N, Sugauchi F, Tanaka Y, Suzuki S, Aal AA, Zaid MA, et al. Genotypes and phylogenetic characterizations of hepatitis B and delta viruses in Egypt. *J Med Virol.* 2003; 70: 529-36
- 42-Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA. Genetic variability in the precore and core promoter regions of Hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterology.* 2006; 6: 20
- 43-Flodgren E, Bengtsson S, knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA, et al. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: Molecular analysis of prevailing Hepatitis B and D virus strains. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3311-316
- 44- Kar P, Polipalli SK, Chttopadhyay S, Hussain Z, Malik A, Husain SA, et al. Prevalence of Hepatitis B virus genotype D in precore mutants among chronic liver diseases patients from New Dehli ,India. *Dig Dis Sci.* 2007; 52: 565-69
- 45- Alaviyan SM, Keyvani H, Rezaie M, Ashayeri N, Sadeghi HM. Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 5211-213
- 46- Vaezjalali M, Alavian SM, Jazayeri SM, Nategh R, Mahmoodi M, Hajibeigi B, et al. Genotype of hepatitis B virus Isolated from Iranian Chronic Carriers of the Virus. *Hepatitis Monthly.* 2008; 8(2): 97-100
- 47- Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with sever liver disease in northern India than is genotype D. *Indian J Gatroenterology.* 2005; 24: 19-22

Using RFLP-PCR and Direct Sequencing to Determine HBV Genotypes in Intravenous Drug User Prisoners in Tehran Province

F.Salem,BS^I M.R.Aghasadeghi,PhD^{II} F.Javadi,MS^{III}
 F.Roohvand,PhD^{II} M.Joolaei,BS^{IV} G.Bahramali,MS^V
 F.Mostafavi,PhD^{VI} H.Gholami,MD^{VII} *S.Hekmat,DVM^{VIII}

Abstract

Background & Aim: Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem. Current researches indicate that 500,000 to 1.2 million deaths per year are caused by chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). HBV genotyping and subtyping provide epidemiological data that may contribute to vaccination and antiviral treatment strategies, diagnostic development, and determination of the course of the disease. Hereby we decided to evaluate the genotype of this virus in prisoners who are addicted to some kinds of injection drugs.

Patients and Method: In this cross-sectional study which was done in Tehran province in 2008, HBV genotypes of serum samples from 122 HBsAg positive intravenous drug user prisoners were determined using cost-effective and standard methods such as PCR and RFLP. Then direct sequencing was utilized to confirm and reevaluate the results of PCR-RFLP. The phylogenetic tree was drawn by computer biosoftware (Bioedit, Mega, ClustalW) and the results were assessed by statistical analysis SPSS v.16 ($P < 0.05$) as well.

Results: 115 samples were reported positive when analyzed by nested PCR. All of these positive samples were reported to be genotype D by RFLP using BsrI, StyI, EaeI, DpnI, and HpaI enzymes. In addition, phylogenetic tree drawn by Neighbor-Joining method in 100% of the subjects confirmed the existence of genotype D (subgenotype D1, subtype ayw2).

Conclusion: 115 HBV isolates from prisoners represent homogenous genotypic diversity, and our results concur with other reports from Iran, all showing that genotype D is the only detectable genotype in this study. This genotype with a low rate of severe liver diseases caused by HBV (cirrhosis, hepatocellular carcinoma) is in accordance with our results.

Key Words: 1) Hepatitis B Genotype 2) HBsAg positive Intravenous Drug User
 3) PCR 4) RFLP

This article is an abstract of Ms. Salem's thesis advised by Dr. Aghasadeghi and read by Dr. Hekmat in partial fulfillment of an MS degree in biochemistry.

I) MS Student of Biochemistry. Payame Noor University. Tehran, Iran.

II) Assistant Professor of Biotechnology. Hepatitis and AIDS Department. Pasteur Institute. Tehran, Iran.

III) MS in Molecular Biology. Pasteur Institute. Hepatitis and AIDS Department. Tehran, Iran.

IV) BS in Biology. Pasteur Institute. Hepatitis and AIDS Department. Tehran, Iran.

V) MS in Genetics. Pasteur Institute. Hepatitis and AIDS Department. Tehran, Iran.

VI) PhD in Statistics. Department of Epidemiology. Pasteur Institute. Tehran, Iran.

VII) MD in Laboratory Sciences. Executive Deputy of Health Reference Laboratory. Tehran, Iran.

VIII) Doctor of Veterinary Medicine (DVM). Hepatitis and AIDS Department. Pasteur Institute. Tehran, Iran.

*(*Corresponding author)*